

**VIABILITAS NON-CYTOPATHIC BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS
ISOLAT BATURADEN**Tri Untari¹, R. Wasito² dan Hastari Wuryastuti³**INTISARI**

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) merupakan virus RNA rantai tunggal positif yang diklasifikasikan ke dalam genus *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*. Virus BVDV menyebabkan penyakit yang mengakibatkan kerugian ekonomi. Berbagai manifestasi akibat infeksi BVDV yaitu infeksi sub-klinik, penurunan produksi susu, imunosupresi, gangguan reproduksi, imunotoleran, infeksi persisten dan *mucosal disease* akut atau kronik. Penelitian ini ditujukan untuk menentukan viabilitas *non-cytopathic* BVDV (NCP-BVDV) isolat Baturaden. Sembilan isolat NCP-BVDV yang disimpan pada suhu 80° C selama 6 bulan, 1 tahun atau 1,5 tahun diuji viabilitasnya dengan *immunoperoxidase monolayer assay* (IPMA). Isolat NCP-BVDV direpropagasi pada biak sel turbinata sapi (BT). Untuk IPMA digunakan poliklonal antibodi-anti BVDV monospesifik dari babi dan sebagai sistem indikator digunakan *Horseradish peroxidase-labelled recombinant protein G*. Berdasarkan hasil penelitian, ternyata hanya empat isolat NCP-BVDV yang menunjukkan reaktifitas sampai penyimpanan 1,5 tahun. Penelitian lanjutan sedang dilakukan tentang kemungkinan pemanfaatan empat isolat tersebut untuk pengembangan perangkat diagnostik modern dan teknologi rekombinan DNA.

(Kata Kunci: NCP-BVDV Baturaden, *Immunoperoxidase Monolayer Assay*, *Horseradish Peroxidase- Labelled Recombinant Protein G*.)

Buletin Peternakan 22 (2): 80 - 87, 1998

¹ Bagian Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan/Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada.

² Bagian Penyakit Dalam, Poliklinik Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan/Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada.

³ Bagian Penyakit Dalam, Poliklinik Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan/Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada.

THE VIABILITY OF NON-CYTOPATHIC BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS OF BATURADEN ISOLATES

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a positive strand RNA virus, currently classified under the genus *Pestivirus* in the family *Flaviviridae*. The BVDV caused a group of economically important diseases. The widespread of disease associated with BVDV infection includes sub-clinical infection, drop in milk production, immunosuppression, reproductive problem, immunotolerance, persistent infection, and acute or chronic mucosal disease. The present study was to determine of the viability of non-cytopathic BVDV (NCP-BVDV) of the Baturaden isolates. Nine NCP-BVDV isolates were kept at -80°C for 6 months, 1 year or 1,5 years and tested for their viability with immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). The NCP-BVDV isolates were repropagated on bovine turbinate cells (BT) line. Subsequently the IPMA was performed using monospecific swine polyclonal antibody anti-BVDV and Horseradish peroxidase-labelled recombinant protein G as indicator system. The result showed that only 4 NCP-BVDV isolates had pattern of reactivity until the assay was terminated on years 1.5. The possibility of these 4 isolates used for development of modern diagnostic kits and DNA recombinant technology is being furtherly investigated.

(Key Words: NCP-BVDV Baturaden, Immunoperoxidase Monolayer Assay, Horseradish Peroxidase-Labelled Recombinant Protein G.).

Pendahuluan

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) disebabkan oleh virus RNA rantai tunggal positif, genus *Pestivirus* dan familia *Flaviviridae*. Aspek penting ekonomi BVDV terutama akibat infeksi *non-cytopathic* (NCP-BVDV) transplacenta sebelum umur kebuntingan induk 4 bulan yang dapat mengakibatkan kawin ulang, mumifikasi, abortus, cacat lahir dan penurunan produksi susu dan daging (berat badan), infeksi persisten NCP-BVDV dan imunoleran. Pedet yang terinfeksi persisten tersebut dapat menjadi sumber infeksi pada sapi-sapi lain yang peka dan beraksi sebagai karier untuk generasi berikutnya (Grotelueschen dan Mortimer, 1988). *Mucosal disease* (MD) akan terjadi jika sapi terinfeksi NCP-BVDV kemudian terjadi superinfeksi dengan biotipe *cytopathic*-BVDV (CP-BVDV) yang dapat berakibat fatal (Thiel and Moennig, 1994). Berdasarkan pada kepekaan biak sel terhadap infeksi BVDV *in vitro*,

maka BVDV dibedakan menjadi 2 biotipe yaitu *cytopathic*-BVDV (CP-BVDV) dan *non-cytopathic* BVDV (NCP-BVDV). Biotipe NCP-BVDV, pada umum-nya, tidak merusak biak sel ketika replikasi. Virus yang sudah masak, dilepaskan dengan sedikit mempengaruhi metabolisme seluler sehingga sel yang terinfeksi masih tetap dapat tumbuh dan membelah, dan tidak menimbulkan efek sitopatik pada biak sel (Fenner *et al.*, 1993). Biotipe CP diduga merupakan mutasi NCP-BVDV sebagian gen p125 (Qi *et al.*, 1992).

Biak sel yang dapat digunakan untuk pertumbuhan BVDV secara optimal yaitu sel turbinata sapi (Wasito *et al.*, 1994), sel *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK) (Collet *et al.*, 1988), sel ginjal fetus sapi, sel testis, sel timus, sel lien embrio sapi (Dubovi, 1990) dan sel paru-paru embrio sapi (Meyling and Jensen, 1988; Welsh *et al.*, 1995). Sel yang kurang optimum untuk pertumbuhan BVDV adalah *cell resistant to infection with BVDV* (CRIB) (Flores and Donis, 1995).

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan viabilitas isolat NCP-BVDV Baturaden yang disimpan pada suhu -80°C selama 6 bulan, 1 tahun ataupun 1,5 tahun. Pada penelitian ini, diharapkan dapat diperoleh *seed* NCP-BVDV Baturaden sebagai isolat unggulan yang selanjutnya memungkinkan untuk dapat dikembangkan dalam pembuatan perangkat diagnosa modern dan vaksin DNA rekombinan BVDV.

Cara Penelitian

Untuk bahan penelitian digunakan supernatan NCP-BVDV yang telah disimpan pada suhu -80°C selama 6 bulan, 1 tahun atau 1,5 tahun di Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Isolat NCP-BVDV tersebut merupakan hasil isolasi dan identifikasi dari sampel sera yang berasal dari sapi perah di Baturaden. Untuk repropagasi isolat NCP-BVDV tersebut digunakan biak sel turbinata sapi (BT). Medium yang diperlukan adalah *eagle's minimal essential medium* (EMEM) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), serum fetus kuda (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), glutamin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), penisilin streptomisin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). Untuk bahan IPMA digunakan poliklonal antibodi monospesifik (S. Bolin, NADC-USDA-ARD, Ames, Iowa, USA), *horseradish peroxidase* (HRP-labelled recombinant protein G) dan substrat (Zymed, Lab. Inc, South San Francisco, CA, USA).

Supernatan isolat NCP-BVDV diinokulasikan pada biak sel BT dalam bejana biakan sel 25 cm^2 . Setelah 3 hari diinkubasi, biak sel tersebut dibeku-cairkan 3x dan supernatan diambil kemudian diuji *immuno-peroxidase monolayer assay* (IPMA) untuk menentukan viabilitas NCP-BVDV. Uji IPMA dikerjakan dengan cara dipersiapkan sel BT dalam mikropelat 96 sumuran yang bagian dasarnya datar dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 5% selama 24 jam.

Setelah inkubasi, sel BT diinokulasi dengan $50\text{ }\mu\text{l}$ supernatan yang telah disimpan selama 6 bulan dan diinkubasikan dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 72 jam. Setelah diinkubasi, sel BT difiksasi dengan aseton 35% yang mengandung *bovine serum albumin* 0,02% dan dikeringkan. Setelah sel BT difiksasi kemudian diberi $50\text{ }\mu\text{l}$ antisera poliklonal monospesifik, iinkubasikan dalam suhu kamar 30 menit. Sel BT dicuci dengan bufer pencuci dan ditambahkan $50\text{ }\mu\text{l}$ *horseradish peroxidase* (HRP-labelled recombinant protein G), diinkubasikan 15 menit pada suhu kamar. Sel BT dicuci dengan bufer pencuci, kemudian ditambahkan sustrat dan diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu kamar selama 60 menit. Sel BT dicuci dengan aquades 2x dan dikeringkan dalam oven 37°C selama 90 menit. Setelah sel BT kering hasil diamati dibawah mikroskop cahaya (Wasito and Wuryastuti, 1996). Supernatan yang menunjukkan positif NCP-BVDV dengan IPMA disimpan 1 tahun atau 1,5 tahun pada suhu -80°C untuk diuji viabilitasnya lagi seperti prosedur yang telah disebutkan di atas. Supernatan yang menunjukkan viabilitas sampai penyimpanan 1,5 tahun kemudian disimpan pada -80°C sebagai *seed* NCP-BVDV.

Hasil dan Pembahasan

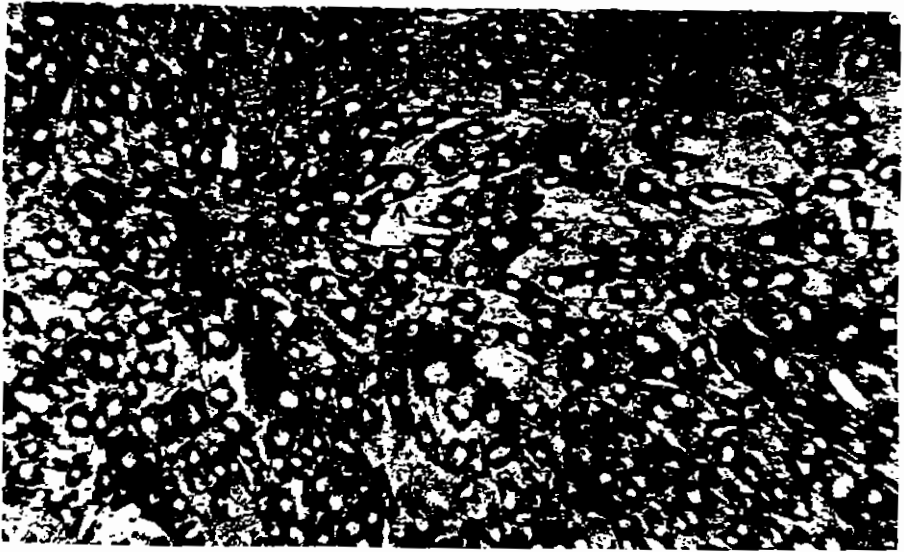
Hasil penelitian menunjukkan dari 9 supernatan isolat NCP-BVDV setelah diuji viabilitasnya dengan IPMA ternyata hanya ada 4 isolat yang menunjukkan viabilitas sampai penyimpanan 1,5 tahun. Hasil negatif NCP-BVDV ditunjukkan oleh adanya sel BT yang terlihat transparan, tidak mengikat warna (Gambar 1-2), sedangkan hasil positif biak sel BT terinfeksi NCP-BVDV ditunjukkan oleh adanya sitoplasma sel BT berwarna coklat kemerahan karena virus tersebut mengalami replikasi dalam sitoplasma, sedangkan intinya normal (tidak mengikat warna) (Gambar 3-4).



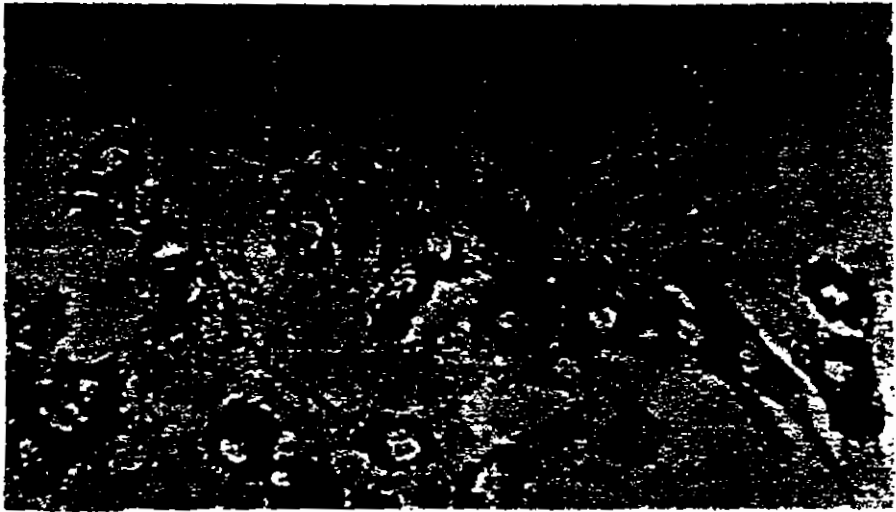
Gambar 1. Gambaran fotomikrograf biak sel turbinata sapi (BT) *in vitro* yang tidak diberi supernatan NCP-BVDV, tetapi diberi antisera monospesifik anti-BVDV (kontrol negatif). Sitoplasma sel BT tampak transparan, tidak mengikat warna dan nukleus kosong (↑) (IPMA, 100x.).



Gambar 2. Gambaran fotomikrograf biak sel turbinata sapi (BT) *in vitro* yang tidak diberi supernatan NCP-BVDV, tetapi diberi antisera monospesifik anti-BVDV (kontrol negatif). Sitoplasma sel BT tampak transparan, tidak mengikat warna dan nukleus kosong (↑) (IPMA, 400x.).



Gambar 3. Gambaran fotomikrograf biak sel turbinata sapi (BT) *in vitro* setelah diinokulasi dengan supernatan NCP-BVDV. Sel BT 72 jam *post-infeksi* diberi antisera monospesifik spesifik anti BVDV. Sistem indikator digunakan *HRP-labelled recombinant protein G*. Sel BT yang positif terinfeksi NCP-BVDV, sitoplasma berwarna coklat kemerahan, nukleus kosong tidak terwarnai (↑) (IPMA, 100x.).



Gambar 4. Gambaran fotomikrograf biak sel turbinata sapi (BT) *in vitro* setelah diinokulasi supernatan NCP-BVDV. Sel BT 72 jam *post-infeksi* diberi antisera monospesifik anti-BVDV. Sistem indikator digunakan *HRP-labelled recombinant protein G*. Sel BT yang positif terinfeksi NCP-BVDV, sitoplasma berwarna coklat kemerahan, nukleus kosong tidak terwarnai (↑) (IPMA, 400x.).

Berdasarkan hasil uji serologis juga telah dilaporkan adanya kejadian BVDV di Indonesia. Beberapa daerah yang sapi-sapinya menunjukkan hasil seropositif terhadap infeksi BVDV yaitu di Sulawesi Tenggara, Kalimantan Selatan, Riau (Jusa *et al.*, 1991), Sulawesi Tengah, Sulawesi Utara, Bali, Kalimantan Barat (Anonimus, 1989) dan di Jawa Tengah, Jawa Timur dan Jawa Barat (Wasito and Maes, 1995; Wasito and Wuryastuti, 1997). Telah diketahui ada 2 biotipe BVDV yaitu *cytopathic* BVDV (CP-BVDV) yang dapat menimbulkan efek sitopatik dan *non-cytopathic* BVDV (NCP-BVDV) yang tidak menimbulkan efek sitopatik pada biak sel. Biotipe NCP-BVDV mengalami mutasi menjadi CP-BVDV dengan cara mengambil urutan basa seluler pada saat terjadinya rekombinasi. Rekombinasi antara RNA viral dan seluler menyebabkan pembentukan genom CP-BVDV. Peristiwa rekombinasi tersebut merupakan inisiator terjadinya *mucosal disease* (MD). Pada genom CP terdapat insersi pada bagian gen p125. Insersi tersebut mempunyai kemiripan urutan basa dengan urutan basa seluler terutama yang menyandi *ubiquitin* (Meyer *et al.*, 1991). *Ubiquitin* berperan untuk aktivasi enzim proteolitik protease (Watson *et al.*, 1987).

Biotipe NCP-BVDV yang tidak berhasil dipropagasi dan tidak menunjukkan viabilitas sampai penyimpanan 1,5 tahun meskipun sudah dilintaskan dalam biak sel BT 3x mungkin karena virus tersebut telah rusak oleh perlakuan beku-cair berulang kali. Isolat BVDV merupakan virus beramplop dan selalu berasosiasi dengan sel sehingga mudah rusak oleh perlakuan tersebut (Blake and O'Connell, 1993). Biotipe NCP-BVDV yang mampu tumbuh pada sel BT mungkin memang berbeda galurnya, sehingga kemampuan untuk tumbuh pun berbeda. Isolat BVDV di lapangan mempunyai keanekaragaman antigenik. Beberapa galur BVDV yang telah teridentifikasi diantaranya galur

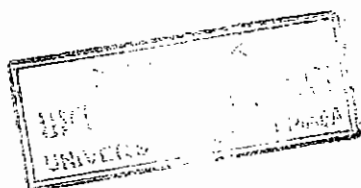
Singer, NADL, Osloss, New York dan Oregon (Ridpath and Bolin, 1990), dan galur lokal (Wasito and Wuryastuti, 1996) ternyata juga telah dilaporkan mempunyai kemampuan tumbuh yang berbeda-beda pada berbagai macam biak sel. Biotipe NCP-BVDV tumbuh dengan titer yang rendah secara *in vitro* ataupun *in vivo* sehingga perlu dilintaskan berulang kali (2-5x), supaya teramplifikasi secara biologi (Robert *et al.*, 1991). Virus BVDV peka terhadap desinfektan klorheksidin, iodoform, fenol, aldehid dan hipoklorid. Di laboratorium, BVDV stabil pada suhu dibawah 10° C. Virus BVDV tahan di tanah pada suhu 25° C selama 26 hari dan di air tempat terbuka selama 14 hari (Duffell and Harkness, 1985).

Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa ada 4 isolat NCP-BVDV yang mempunyai viabilitas sampai penyimpanan 1,5 tahun sehingga isolat tersebut dapat dimanfaatkan sebagai *seed* NCP-BVDV dan setelah melalui penentuan karakterisasi lebih lanjut (imunologik dan molekuler) kemungkinan dapat dimanfaatkan dalam pengembangan pembuatan perangkat diagnosis modern dan vaksin DNA rekombinan BVDV di Indonesia.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Tim Manajemen Program Doktor Direktorat Pendidikan Tinggi, Rektor Universitas Gadjah Mada, Direktur Pasca Sarjana dan Direktur PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, dan Prof. Roger. K. Maes atas saran dan diskusi dan semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.



Daftar Pustaka

- Anonimus, 1989. *Bulletin Informasi Kesehatan Hewan*. Direktorat Kesehatan Hewan, Dirjen Peternakan, Departemen Pertanian, Jakarta: 7-14.
- Blake, K. and S. O'Connell. 1993. *Virus Culture*. Dalam Harper, D.R. Virology Labfax. Bios Scientific, Academic Press, United Kingdom.
- Collett, M.S., R. Larson, C. Gold, D. Strick, D.K. Anderson, and A.F. Purchio. 1988. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhea Virus. *Virology*. 165: 191-199.
- Dubovi, E.J. 1990. The Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea Infections: A Laboratory View. *Vet. Med.* October: 1133-1139.
- Duffell, S.J. and J.W. Harkness. 1985. Bovine Virus Diarrhoea-Mucosal Disease Infection in Cattle. *Vet. Rec.* 117: 240-245.
- Fenner, E.J., E.P.J. Gibbs, F.A. Murphy, R. Rott, M.J. Studdert and D.O. White. 1993. *Veterinary Virology*. Academic Press, Inc., USA.
- Flores, E.F. and R.O. Donis. 1995. Isolation of A Mutant MDBK Cell Line Resistant to Bovine Viral Diarrhea Virus Infection Due to A Block in Viral Entry. *Virology*. 208: 565-575.
- Grotelueschen, M. and R.G. Mortimer. 1988. Persistent Infection and Immunological Aspects of BVD Virus in Beef Cattle. *The Bovine Practitioner*. 23: 52-55.
- Jusa, E.R., G. Mudiarto, M.A.R. Noor dan Siregar, S.B. 1991. Uji Serologik Terhadap Diare Ganas pada Sapi (DGS) di Indonesia. *Kongres PDHI*, Yogyakarta.
- Meyer, G., T. Rumenapf, and H.J. Thiel. 1989. Molecular Cloning Nucleotide Sequence of the Genom of Hog Cholera Virus. *Virology*. 171:555-567.
- Meyling, A. and A.M. Jensen. 1988. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) by Artificial Insemination (AI) with Semen from A Persistently-Infected Bull. *Vet. Microb.* 17: 97-105.
- Qi, F., J.F. Ridpath, T., Lewis, S.R. Bolin and E.S. Berry. 1992. Analysis of the Bovine Viral Diarrhea Genom for Possible Cellular Insertions. *Virology*. 189: 285-292.
- Ridpath, J.F. and S.R. Bolin. 1990. Viral Protein Production in Homogeneous and Mixed Infections of Cytopathic and Noncytopathic BVD Virus. *Arch. Virol.* 111: 247-256.
- Roberts, K.L., J.K. Collins, J. Carman and C.D. Blair. 1991. Detection of Cattle Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus Using Nucleic Acid Hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 10-15.
- Thiel, H.J. and V. Moennig. 1994. The Molecular of Pathogenesis of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection. *OIE Vet. Biotech.* 4: 143-152.
- Wasito, R., R.K. Maes, B. Sardjono and H. Wuryastuti. 1994. Evidence for the Presence of Bovine Viral Diarrhea Virus in Dairy Cattle in Biotechnology of Agriculture Viruses. *ISPS-UGM*. Yogyakarta, Indonesia.
- Wasito, R. and R.K. Maes. 1995. Application of ELISA and Development of IPMA to Detect NCP-BVDV in Indonesian Cattle. *World Veterinary Congress*. Yokohama, Japan.
- Wasito, R. and H. Wuryastuti. 1996. Re propagation and Reidentification of the Indonesian Non-cytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Isolates *in vitro*: Means of Immunoperoxidase Monolayer Assay. *I.J. Biotech.* June: 28-35.
- Wasito, R. and H. Wuryastuti. 1997. Serological Evidence for the Presence of Antibodies to Bovine Viral Diarrhea

Virus in Rural Indonesian Cattle. *I.J. Biotech. June*: 107-112.

Watson, J.D., N.H. Hopkins, J.W. Roberts, Steitz, J.A. and A.M. Weiner. 1987. *Molecular Biology of the Gene*. Fourth Ed. The Benjamin

Commisioning Publishing Corp. Inc. Menlo Park, California.

Welsh, M.D., B.M Adair and J.C. Foster. 1995. Effect of BVD Virus Infection on Alveolar Macrophage Functions. *Vet. Immun. and Immunopath.* 46: 195-210.